

ПРОБЛЕМИ БІОТЕХНОЛОГІЇ

УДК 576.8.52; 579.083.13

Л.М. Шинкаренко, Н.В. Дехтяренко,
Т.С. Тодосійчук

ЧУТЛИВІСТЬ КЛІТИННИХ СТІНОК МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ ДО ДІЇ ЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ

Вступ

На сьогодні пробіотичні препарати виходять на передові позиції у сфері регуляції природних сил організму. Все чіткіше вимальовується розуміння їх ролі у формуванні гомеостазу організму при взаємодії його систем. Міжнародний конгрес з медицини пробіотиків, який відбувся у США в 2002 р., констатував перспективність застосування пробіотиків, запропонувавши вважати XXI сторіччя ерою пробіотиків [1].

Основними вимогами до класичних пробіотиків є добра приживаність у кишечнику та нормалізація мікрофлори і, з огляду на це, — стійкість клітин пробіотичних культур до ряду факторів середовища шлунково-кишкового тракту: підвищеної кислотності, жовчі і ферментів підшлункової залози [2–5].

В останні роки стало очевидним, що при створенні пробіотичних препаратів також слід враховувати їх здатність до модуляції імунної відповіді, яку забезпечують структурні одиниці основного компонента клітинної стінки — пептидоглікану [6–8], тобто для реалізації імунomodуючих властивостей пробіотичні препарати мають відзначатись підвищеною чутливістю до дії гідролітичних ферментів шлунково-кишкового тракту і лізоциму, яка реалізується через особливості структури клітинних стінок пробіотичних культур.

Таким чином, чутливість клітинних стінок потенційних пробіотичних продуцентів до дії гідролітичних ферментів різної природи можна використовувати як критерій відбору при створенні пробіотиків цільового призначення з підвищеним рівнем імунomodуючої дії.

Постановка задачі

Мета статті — визначення впливу умов культивування, а саме кислотності середовища культивування, окремих компонентів живильного середовища та дії хіміотерапевтичних препара-

тів на чутливість клітинних стінок молочнокислих бактерій до гідролізуючих ферментів.

Матеріали і методи експериментальних досліджень

У даній статті використовувались штами бактерій роду *Lactobacillus*, взяті в музеї культур мікроорганізмів кафедри промислової біотехнології ФБТ НТУУ “КПІ”: *L. murinus* LE IMB B-7037, *L. rhamnosus* LB3 IMB B-7038, *L. sp.* LB4, *L. acidophilus* (Canada), *L. acidophilus* EP 317/402 (Narine), *L. bulgaricus* LB51, *L. delbrueckii* NCDO 213.

Зберігання штамів молочнокислих бактерій здійснювалось при 4 °С на середовищі MRS з додаванням 0,2 % агару [9], культивування — при 37 °С на капустиному середовищі [10] і середовищі MRS та його модифікаціях: MRS_p, MRS_b, MRS_{ji} (модифікація середовища полягала у введенні до його складу “Йодис” води, твіну 80 або обох компонентів разом) [11]. Поживні середовища стерилізувались при 0,8 МПа протягом 30 хв.

Кислотність рН середовища культивування підтримувалась на рівні 6,0–6,5 при використанні як коректора 16 %-ного розчину NaOH і вимірювалась за допомогою рН-метра марки рН-150.

Лізис клітин лактобактерій проводився за методикою, основи якої викладені в [12, 13]. Методику розроблено для препарату “циторецифен” на основі літичного ферментного комплексу актиноміцету *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* IMB Ac-5001 з музею культур мікроорганізмів кафедри промислової біотехнології ФБТ НТУУ “КПІ”. До складу ферментного комплексу входять ферменти різної специфічності: протеїнази, пептидази, мурамідази, колагеназа, бактеріолітичні ферменти, які забезпечують високу ефективність “циторецифену” у процесі лізису молочнокислих бактерій виду *L. delbrueckii*.

Було використано різні навантаження ферментного препарату на 1 см³ суспензії клітин досліджуваних штамів лактобактерій. Вихідна концентрація розчину “циторецифену” з активністю 140000 ЛО/г становила 60 мг/мл.

Літична чутливість культур молочнокислих бактерій розраховувалась за формулою (1)

$$\% \text{OD}_{540} = \frac{\text{OD}_{540}^{\text{вих}} - \text{OD}_{540}^{\text{кін}}}{\text{OD}_{540}^{\text{вих}}} \cdot 100, \quad (1)$$

де $\%OD_{540}$ – зниження оптичної густини суспензії клітин молочнокислих бактерій через певний проміжок часу; $OD_{540}^{вих}$ – оптична густина клітинної суспензії до інкубації з ферментним препаратом; $OD_{540}^{кін}$ – оптична густина клітинної суспензії після інкубації з ферментним препаратом.

Використовувались також цитостатики, різні за хімічною структурою та механізмом дії: Adriablastin, Cisplatin, Cytophosphan, Tegafur, Thiophosphamide [10].

Культури лактобактерій, оброблені цитостатиками за методикою, викладеною в [10], пересівались на капустяне поживне середовище в кількості 4% і культивувались 24 год та проводився лізис.

Результати і обговорення

Першим із проведених досліджень з визначення впливу умов культивування на чутливість клітинних стінок лактобактерій до дії літичних ферментів був аналіз залежності літичної чутливості клітинної стінки від кислотності середовища культивування. Відомо, що під час росту культури рН культуральної рідини значно впливає на природу клітинної поверхні [14]. Тим часом, коливання рН середовища в діапазоні 5,5–7,5, як правило, не чинить суттєвого впливу на ферментативну активність молочнокислих бактерій [15].

Результати, наведені на рис. 1, показують, що чутливість клітин лактобактерій до літично-

го впливу після проведення корекції рН культуральної рідини в ході культивування розчином NaOH збільшується в 3–6 разів у всіх випадках при використанні для лізису різних вихідних концентрацій клітин. Крім того, в даному разі значно скорочується тривалість процесу лізису: 83–90 %-ний лізис біомаси відбувається протягом 30 хв.

Визначену можливість зміни літичної чутливості клітинної стінки молочнокислих бактерій в процесі культивування з корекцією кислотності середовища необхідно враховувати при виробництві пробіотичних препаратів.

Вивчення впливу окремих компонентів середовища культивування на літичну чутливість клітинних стінок лактобактерій (рис. 2) показало, що клітини кожного штаму мають різний рівень чутливості до дії літичного агента. Аналіз результатів лізису клітин культур лактобактерій на модифікованих варіантах середовища MRS опосередковано свідчить про істотну залежність формування структури клітинної стінки кожного штаму від наявності індукуючих факторів у середовищі культивування.

Найменшою чутливістю до дії літичного ферментного комплексу відзначались клітини штамів *L. ghamnosus* LB3 і *L. sp.* LB4 незалежно від типу середовища, що свідчить про докорінну відмінність структури їх клітинних стінок. Літична чутливість інших робочих культур лактобактерій значно більшою мірою залежала від природи індукційних факторів, що вносились у середовище культивування. Глибина лізису клітин штамів *L. murinus* LE, *L. acidophilus* (Cana-

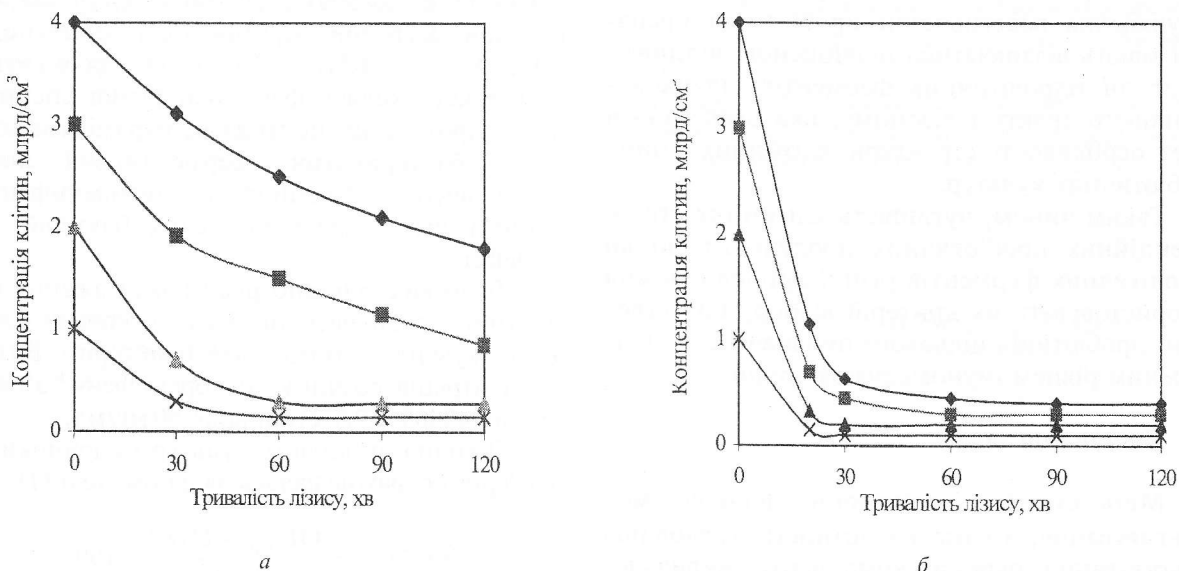


Рис. 1. Вплив корекції рН середовища на літичну чутливість клітин *L. murinus* LE: а – без корекції рН; б – з корекцією рН

da), *L. acidophilus* EP 317/402 (Narine), *L. bulgaricus* LB51 була вища на 3–31 % на модифікованих середовищах MRS.

Тим часом, клітини штамів *L. rhamnosus* LB3 і *L. delbrueckii* NCDO 213 при наявності твіну і йодної сполуки (середовища MRS_f, MRS_t, MRS_j) втрачали 50 % літичної чутливості, що свідчить про формування жорсткішої структури клітинної оболонки на вказаних середовищах.

Встановлена особливість зниження рівня літичної чутливості клітинної стінки є одним з основних факторів, який слід враховувати при створенні класичних пробіотичних препаратів із прологнованою життєздатністю клітин продуцента в умовах дії ферментів шлунково-кишкового тракту. В цьому випадку виникає потреба довгострокової колонізації кишечника для створення умов повноцінної реалізації в організмі хворого терапевтичного потенціалу пробіотичних клітин і, в першу чергу, – антагоністичного.

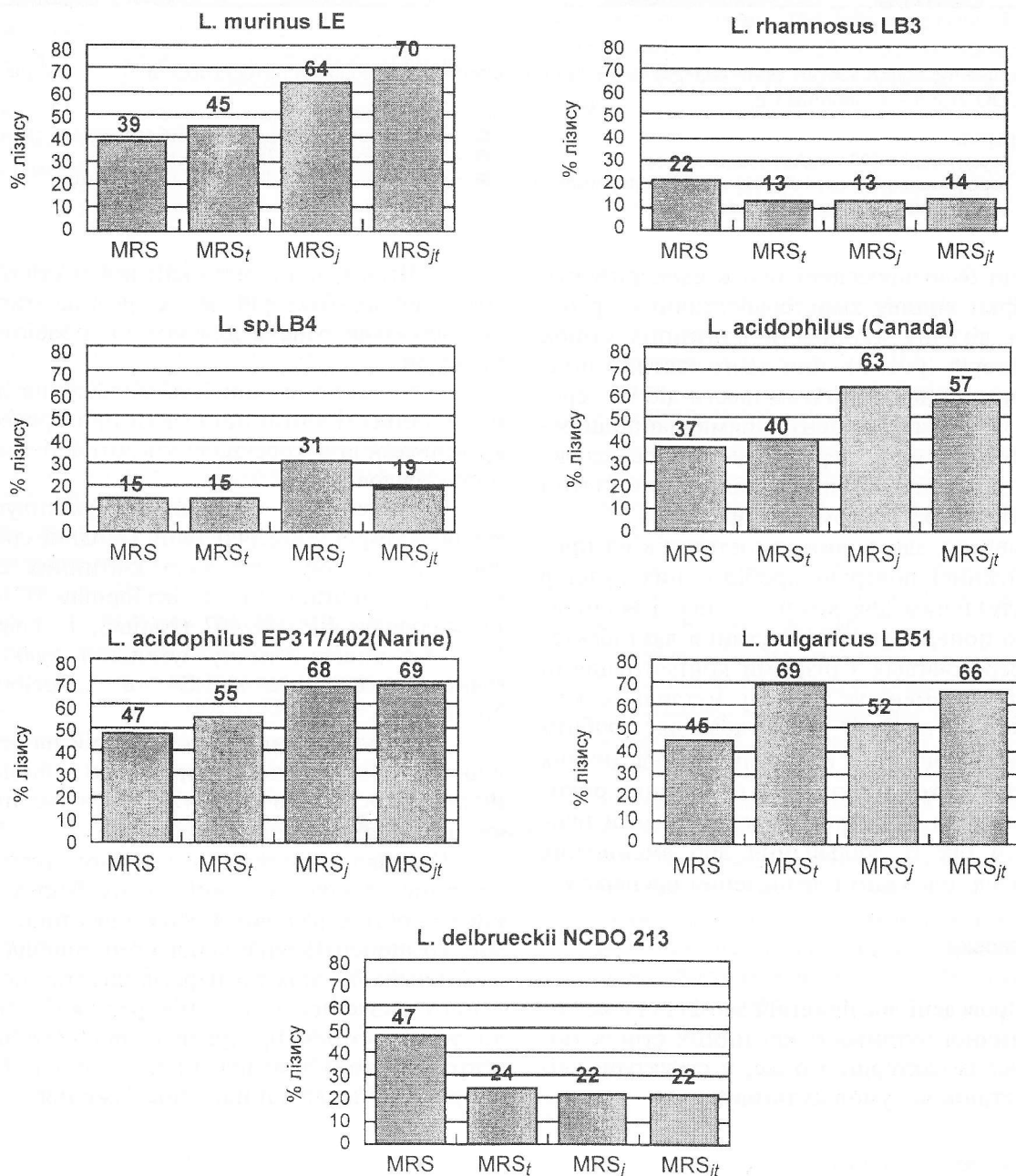


Рис. 2. Літична чутливість культур лактобактерій на середовищі MRS і його модифікаціях

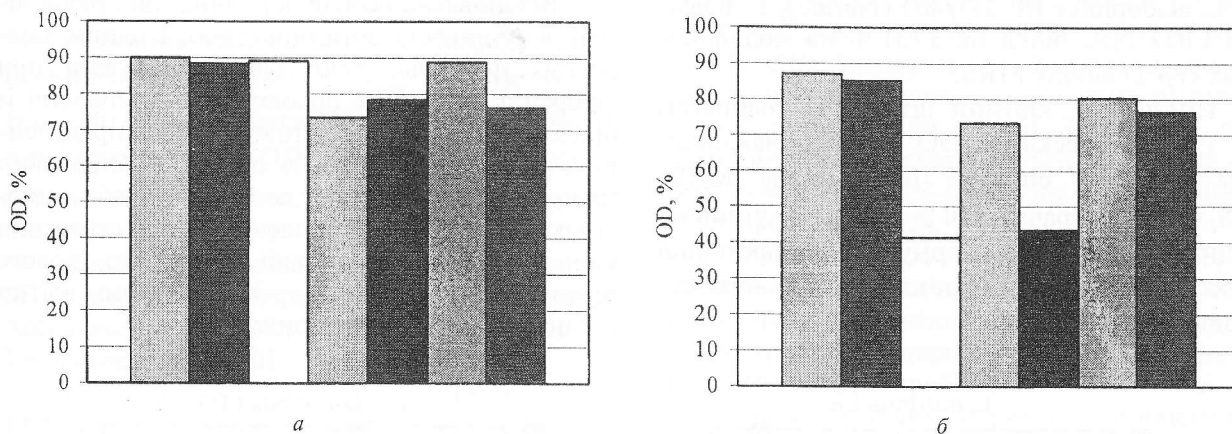


Рис. 3. Літична чутливість клітин лактобактерій до дії "циторецифену" після обробки цитостатиками: а – *L. delbrueckii* NCDO 213; б – *L. murinus* LE;

- – контроль;
- – на середовищі з 500 мкг/мл cytophosphan;
- – на середовищі з 7,8 (а) і 3,9 (б) мкг/мл cytophosphan;
- – на середовищі з 250 мкг/мл cisplatin;

- – на середовищі з 31,5 (а) і 15,6 (б) мкг/мл cisplatin;
- – на середовищі з 125 мкг/мл tegafur;
- – на середовищі з 3,9 мкг/мл тіофосфамід

Нами були проведені також експерименти з перевірки впливу хіміотерапевтичних препаратів на літичну чутливість клітинних стінок лактобактерій (рис. 3). Для цього клітини штампів витримувалися протягом шести діб на середовищі з різними концентраціями найпоширеніших цитостатиків, пересівалися на середовище без цитостатика і проводився лізис клітин ферментним препаратом "циторецифен".

Виявлено, що вплив цитостатиків на природу клітинної поверхні пробіотичних культур є індивідуальним для кожної з них, і встановлено, що попереднє культивування лактобактерій на середовищах з різними концентраціями цитостатиків зменшує літичну чутливість клітинної стінки на 2–47%. Це дозволяє зробити припущення, що при включенні пробіотичних препаратів у схеми лікування при різних онкозахворюваннях необхідно корегувати дози пробіотику в бік їх збільшення або зменшення залежно від цільового призначення препарату.

Висновки

1. Проведені дослідження засвідчили залежність літичної чутливості клітинних стінок молочнокислих бактерій, а отже, й структури клітинних стінок від умов культивування.

2. Літична чутливість клітинних стінок молочнокислих бактерій може розглядатися як індивідуальна ознака для кожної пробіотичної культури.

3. Доведено можливість збільшення літичної чутливості клітинної стінки при проведенні культивування з корекцією кислотності живильного середовища.

4. Внесення в середовище культивування модифікаторів у вигляді твіну і йодної сполуки збільшує літичну чутливість клітинних стінок культур *L. murinus* LE, *L. acidophilus* (Canada), *L. acidophilus* EP 317/402 (Narine), *L. bulgaricus* LB51 і зменшує літичну чутливість культур *L. rhamnosus* LB3, *L. sp.*LB4 та *L. delbrueckii* NCDO 213.

5. Культивування лактобактерій на середовищах із різними концентраціями найпоширеніших цитостатиків на 2–47% зменшує літичну чутливість клітинної стінки.

Показана залежність літичної чутливості клітинної стінки молочнокислих бактерій від кислотності середовища культивування, окремих компонентів живильного середовища та дії хіміотерапевтичних препаратів вимагає поглибленого вивчення механізмів регуляції синтезу клітинних стінок продуцентів пробіотиків різного цільового призначення, на що й будуть направлені подальші наші дослідження.

Л.Н. Шинкаренко, Н.В. Дехтяренко,
Т.С. Тодосійчук

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК
МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ К ДЕЙСТВИЮ
ЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

Исследовано влияние кислотности среды культивирования, отдельных компонентов питательной среды и действия химиотерапевтических препаратов на структурные изменения клеточных стенок молочнокислых бактерий путем определения их литической чувствительности к гидролитическим ферментам. Установлена возможность изменения литической чувствительности клеточной стенки в зависимости от условий культивирования. Выявлено, что литическая чувствительность клеточных стенок молочнокислых бактерий может рассматриваться в качестве индивидуального признака для каждой пробиотической культуры.

L.M. Shynkarenko, N.V. Dekhtyarenko,
T.S. Todosiychuk

SENSITIVITY OF CELL WALLS OF LACTIC ACID
BACTERIA TO LYTIC ENZYMES

The influence of acidity of cultivation medium, separate components of the medium and action of chemiotherapeutic preparations on structural changes of cell walls of lactic acid bacteria have investigated, by defining their lytic sensitivity to hydrolases. The capability of change of lytic sensitivity of a cell wall depending on the culture conditions has been established. The lytic sensitivity of cell walls of lactic acid bacteria can be considered as the individual characteristic for each of probiotics culture.

1. Коваленко Н.К., Підгорський В.С. Пробиотики на основі молочнокислих бактерій: сучасний стан та перспективи // X з'їзд Тов-ва мікробіологів України: Тези доп. 15–17 вересня 2004 р., Одеса. – Одеса: Астропринт, 2004. – 408 с.
2. Смирнов В.В., Коваленко Н.К., Подгорский В.С., Сорокулова И.Б. Пробиотики на основе живых культур микроорганизмов // Микробиологичний журнал. – 2002. – 64, № 4. – С. 62–80.
3. Янковский Д.С. Микробная экология человека: современные возможности ее поддержания и восстановления. – К.: Эксперт ЛТД, 2005. – 362 с.
4. Dunne C., O'Mahony L., Murphy L. et al. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings // American Journal of Clinical Nutrition. – 2001. – 73(suppl). – P. 386–392.
5. Tuomola E., Crittenden R., Playne M. et al. Quality assurance criteria for probiotic bacteria // Ibid. – P. 393–398.
6. Єланська Н.О., Кур'ята Н.В., Філіппова Т.О., Іваниця В.О. Вплив лактобактерій на функціональну активність макрофагів та реакцію гіперчутливості сповільненого типу // Микробиологичний журнал. – 2003. – 65, № 4. – С. 23–28.
7. Суглобов Є.В. Порівняльний вплив пептидогліканів та тейхоевих кислот на функціональну активність імунної системи: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Харків, 2001. – 20 с.
8. Yasui H., Shida K., Matsuzaki T. et al. Immunomodulatory function of lactic acid bacteria // Antonie Van Leeuwenhoek. – 1999. – 76(1–4). – P. 383–389.
9. Квасников Е.И., Нестеренко О.А. Молочнокислые бактерии и пути их использования. – М.: Наука, 1975. – 384 с.
10. Шинкаренко Л.М., Дехтяренко Н.В. Дослідження впливу цитостатиків на клітини лактобактерій // Наукові вісті НТУУ “КПІ”. – 2004. – № 1. – С. 135–141.
11. Азізпур Халіль. Оптимізація процесів культивування у виробництві пробиотичних препаратів на основі лактобацил: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – К., 2004. – 23 с.
12. Тодосійчук Т.С. Розробка технології гідролітичного ферментного препарату циторецифен: Автореф. дис. ... канд. техн. наук. – К., 2000. – 20 с.
13. Тодосійчук Т.С., Шинкаренко Л.М., Поводзинський В.М. Використання гідролітичних ферментів для одержання препаратів – імунокоректорів мікробного походження // Тези доповідей Міжнар. наук.-техн. конф. “Розробка та впровадження прогресивних ресурсощадних технологій та обладнання в харчову та переробну промисловість”. – К.: УДУХТ, 1997. – С. 45.
14. Перт Д.С. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. – М.: Мир, 1978. – 176 с.
15. Непрерывное культивирование молочнокислых бактерий с целью накопления биомассы и продуктов метаболизма: Обзорная информация. – М., ЦНИИиТЭИ мясомолпром, 1979.

Рекомендована Радою факультету
біотехнології і біотехніки
НТУУ “КПІ”

Надійшла до редакції
27 грудня 2005 року